

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/53, 15/62, 15/82, 5/10, 9/02, A01H 5/00, 5/10	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/24585 (43) Date de publication internationale: 20 mai 1999 (20.05.99)
---	-----------	--

<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02374</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 novembre 1998 (06.11.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/14264 7 novembre 1997 (07.11.97) FR</p> <p>(71) Déposant: RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).</p> <p>(72) Inventeurs: BOUDEC, Philippe; 7, rue Camille de Neuville, F-69009 Lyon (FR). BOURDON, Hélène; 8, allée des Tullistes, F-69130 Ecully (FR). DUMAS, Florence; 3, rue de la Pêcherie, F-69250 Fleurieu sur Saône (FR). RODGERS, Matthew; Rhône-Poulenc Agriculture Ltd., Fyfield Road, Ongar, Essex CM5 0HW (GB). SAILLAND, Alain; 38, rue Albert Chalinel, F-69009 Lyon (FR).</p> <p>(74) Mandataire: TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
---	---

(54) Title: MUTATED HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE, DNA SEQUENCE AND METHOD FOR OBTAINING HERBICIDE-TOLERANT PLANTS CONTAINING SUCH GENE

(54) Titre: HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE MUTÉE, SÉQUENCE D'ADN ET OBTENTION DE PLANTES CONTENANT UN TEL GÈNE, TOLÉRANTES AUX HERBICIDES

(57) Abstract

The invention concerns a nucleic acid sequence coding for a mutated hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) with improved tolerance to HPPD inhibitors, a chimera gene containing said sequence as coding sequence and its use for obtaining plants resistant to certain herbicides.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une séquence d'acide nucléique codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD) mutée présentant une tolérance améliorée aux inhibiteurs d'HPPD, un gène chimère contenant cette séquence comme séquence codante et son utilisation pour l'obtention de plantes résistantes à certains herbicides.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase mutée, séquence d'ADN et obtention de plantes contenant un tel gène, tolérantes aux herbicides.

5 La présente invention concerne une séquence d'acide nucléique codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD) mutée, un gène chimère contenant cette séquence comme séquence codante et son utilisation pour l'obtention de plantes résistantes à certains herbicides.

10 Les hydroxy-phényl pyruvate dioxygénases sont des enzymes qui catalysent la réaction de transformation du para-hydroxy-phényl-pyruvate (HPP) en homogentisate. Cette réaction a lieu en présence de fer (Fe^{2+}) en présence d'oxygène (Crouch N.P. & al., Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, 1997). On peut émettre l'hypothèse que les HPPD contiennent un site actif apte à catalyser cette réaction dans lequel viennent se lier le fer, le substrat et la molécule d'oxygène, un tel site actif n'ayant jamais été décrit à ce jour.

15 On connaît par ailleurs certaines molécules inhibitrices de cette enzyme, qui viennent se fixer à l'enzyme de manière compétitive pour inhiber la transformation de l'HPP en homogentisate. Certaines de ces molécules ont trouvé un emploi comme herbicides, dans la mesure où l'inhibition de la réaction dans les plantes conduit à un blanchiment des feuilles des plantes traitées, et à la mort des dites plantes (Pallett K. E. et
20 al. 1997 Pestic. Sci. 50 83-84). De tels herbicides ayant pour cible l'HPPD décrits dans l'état de la technique sont notamment les isoxazoles (EP 418 175, EP 470 856, EP 487 352, EP 527 036, EP 560 482, EP 682 659, US 5 424 276) en particulier l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631), en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2- SO_2 CH_3 -4- CF_3 phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-
25 1-(2- SO_2 CH_3 -4-2,3 Cl_2 phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195), en particulier la sulcotrione ou encore les pyrazolines.

Pour rendre les plantes tolérantes aux herbicides, on dispose de trois stratégies principales, (1) la détoxification de l'herbicide par une enzyme venant transformer l'herbicide, ou son métabolite actif, en produits de dégradation non toxique, comme par
30 exemple les enzymes de tolérance au bromoxynil ou au basta (EP 242 236, EP 337 899) ; (2) la mutation de l'enzyme cible en une enzyme fonctionnelle moins sensible à l'herbicide, ou son métabolite actif, comme par exemple les enzymes de tolérance au

glyphosate (EP 293 356, Padgett S. R. & al., J. Biol. Chem., 266, 33, 1991) ; ou (3) la surexpression de l'enzyme sensible, de manière à produire dans la plante des quantités suffisantes d'enzyme cible au regard des constantes cinétiques de cette enzyme vis à vis de l'herbicide de manière à avoir suffisamment d'enzyme fonctionnelle, malgré la présence de son inhibiteur.

C'est cette troisième stratégie qui a été décrite pour obtenir avec succès des plantes tolérantes aux inhibiteurs d'HPPD (WO 96/38567), étant entendu que pour la première fois une stratégie de simple surexpression de l'enzyme cible sensible (non mutée) était employée avec succès pour conférer aux plantes une tolérance à un niveau agronomique à un herbicide.

Malgré le succès obtenu avec cette stratégie de simple surexpression de l'enzyme cible, il reste nécessaire d'améliorer le système de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD, pour obtenir une tolérance quelques soient les conditions de culture des plantes tolérantes ou les doses commerciales d'application des herbicides dans les champs.

La présente invention concerne donc en premier lieu une HPPD mutée, qui tout en étant fonctionnelle, c'est à dire conservant ses propriétés de catalyse de la transformation de l'HPP en homogentisate, est moins sensible aux inhibiteurs d'HPPD que l'HPPD native, avant mutation.

Au regard du caractère compétitif de l'inhibition, on émet l'hypothèse que les inhibiteurs d'HPPD viennent se lier à l'enzyme dans le site actif de cette dernière, ou à proximité de celui-ci, de manière à bloquer l'accès de l'HPP à ce site actif et empêcher sa transformation en présence de fer et d'oxygène. En effectuant une mutation qui limite l'accès de l'inhibiteur au site actif de l'enzyme tout en préservant l'accès de l'HPP à ce dernier, on peut obtenir des enzymes mutées fonctionnelles, moins sensibles aux inhibiteurs d'HPPD.

On a maintenant constaté qu'en effectuant une mutation de l'enzyme dans sa partie C-terminale, il était possible d'obtenir des HPPD fonctionnelles moins sensibles aux inhibiteurs d'HPPD, de manière que leur expression dans les plantes permette une tolérance améliorée aux inhibiteurs d'HPPD.

La présente invention concerne donc une nouvelle HPPD mutée fonctionnelle, moins sensible aux inhibiteurs d'HPPD, comprenant au moins une mutation dans sa partie C-terminale.

Par « mutation » on entend selon l'invention la substitution d'un acide aminé de la séquence primaire par un autre acide aminé. On emploiera ci-après l'expression « acide aminé muté » pour désigner l'acide aminé remplacé par un autre, désignant le site de la mutation sur la séquence primaire de la protéine.

- 5 Plusieurs HPPD et leur séquence primaire ont été décrites dans l'état de la technique, notamment les HPPD de bactéries comme *Pseudomonas* (Rüetschi & al., Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, WO 96/38567), de plantes comme d'*Arabidopsis* (WO 96/38567, Genebank AF047834) ou de carotte (WO 96/38567, Genebank 87257), de *Coccicoides* (Genebank COITRP), ou de mammifères comme la souris ou le cochon.
- 10 L'alignement de ces séquences connues, par les moyens usuels de la technique, comme par exemple la méthode décrite par Thompson, J.D. & al. (CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680, 1994), et l'accès à ces programmes informatiques d'alignement
- 15 de séquences accessibles par exemple via internet, l'homme du métier peut définir les homologies de séquence par rapport à une séquence de référence, et retrouver les acides aminés clés, ou encore définir des régions communes, notamment permettant de définir une région C-terminale et une région N-terminale à partir de cette séquence de référence.

- Pour la présente invention, la séquence de référence est la séquence de
- 20 *Pseudomonas*, toutes les définitions et indications de positions d'acides aminés particuliers étant faites par rapport à la séquence primaire d'HPPD de *Pseudomonas*. La figure 1 en annexe représente un alignement de plusieurs séquences d'HPPD décrites dans l'état de la technique, alignées par rapport à la séquence d'HPPD de *Pseudomonas* comme référence, comprenant les séquence d'HPPD de *Streptomyces avermitilis* (Genebank SAV11864), de
- 25 *Daucus carota* (Genebank DCU 87257), d'*Arabidopsis thaliana* (Genebank AF047834), de *Zea mais*, de *Hordeum vulgare* (Genebank HVAJ693), de *Mycosphaerella graminicola* (Genebank AF038152), de *Coccicoides immitis* (Genebank COITRP) et de *Mus musculus* (Genebank MU54HD). La numérotation des acides aminés de la séquence de *Pseudomonas* est donnée sur cette figure, de même que les acides aminés communs à ces séquences,
- 30 désignés par une astérisque. Sur la base d'un tel alignement il est aisé d'identifier à partir de la définition de l'acide aminé de *Pseudomonas* par sa position et sa nature, la position de l'acide aminé correspondant dans une autre séquence d'HPPD (l'alignement de

séquences de différentes origines, plantes, mammifères, bactéries, montrant que cette méthode d'alignement bien connue de l'homme du métier peut être généralisée à toute autre séquence). Un alignement de différentes séquences d'HPPD est également décrit dans la demande de brevet WO 97/49816.

5 La partie C-terminale des HPPD, siège du site actif de l'enzyme, se distingue par un peptide de liaison de sa partie N-terminale, assurant la stabilité de l'enzyme et son oligomérisation (l'HPPD de *Pseudomonas* est un tétramère, celles de plantes sont des dimères) comme le montre la représentation schématique de la structure ternaire du monomère de l'HPPD de *Pseudomonas* représentée en figure 2. Cette structure a été
10 obtenue par les méthodes usuelles d'étude de la diffraction aux rayons X de cristaux. Le peptide de liaison va permettre de définir l'extrémité N-terminale de la partie C-terminale de l'enzyme, ledit peptide se situant entre les acides aminés 145 et 157 pour *Pseudomonas* (c.f. figure 1).

 La partie C-terminale peut donc être définie comme constituée par la séquence
15 définie d'une part par le peptide de liaison, et d'autre part par l'extrémité C-terminale de l'enzyme, la mutation effectuée dans la partie C-terminale d'HPPD étant donc effectuée dans la zone ainsi définie. Sur l'alignement de séquences représenté sur la figure 1 en annexe, on remarque pour toutes les séquences deux acides aminés en position 161 et 162 pour la séquence de *Pseudomonas*, (D = Asp161 et H = His162). Par référence à l'HPPD
20 de *Pseudomonas*, on peut donc définir que le peptide de liaison représentant l'extrémité N-terminale de la partie C-terminale de l'HPPD se situe entre environ 5 et 15 acides aminés en amont de l'acide aminé Asp161.

 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la mutation est effectuée sur des acides aminés, qui sont remplacés par des acides aminés d'encombrement stérique
25 supérieur ou encore un des acides aminés ionisés ou ionisables. De préférence, la mutation est effectuée sur des acides aminés de faible encombrement stérique. Par acide aminé de faible encombrement stérique, on entend de préférence selon l'invention la glycine ou les acides aminés d'encombrement stérique faible comme l'alanine, la cystéine, la sérine....

 Tout acide aminé d'encombrement stérique supérieur à celui de l'acide aminé
30 remplacé peut être employé pour la mutation selon l'invention. De manière préférentielle, on remplacera les acides aminés du site de mutation par les acides aminés suivants : leucine, isoleucine ou tryptophane.

Par acide aminé ionisé ou ionisable, on entend selon l'invention tout acide aminé présentant outre les groupes entrant dans la liaison peptidique, un groupe amino, acide carboxylique (COOH), ou encore ammonium ou -COO⁻. Il s'agit de préférence des acides aminés suivants : glutamine et acide glutamique ou asparagine ou acide aspartique.

5 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la mutation sera effectuée sur un acide aminé de la partie C-terminale commun à plusieurs séquences d'HPPD, ces derniers pouvant être identifiés par la méthode d'alignement de séquence.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'HPPD mutée comprend dans sa partie C-terminale, la séquence peptidique suivante :

10 - Gly - Phe - Xaa - Yaa - Xab - Asn - Phe - Yab - Yac - Leu - Phe -

dans laquelle Xaa et Xab représentent indépendamment l'un de l'autre la glycine (Gly) ou un acide aminé d'encombrement supérieur à la glycine, étant entendu que si l'un de Xaa ou Xab représente Gly, alors l'autre est différent de Gly,

Yaa représente un acide aminé quelconque, de préférence Ala, Lys ou Glu⁺,

15 Yab représente un acide aminé quelconque, de préférence Lys, Ser, Arg ou Asn⁺, et

Yac représente un acide aminé quelconque, de préférence Ala, Ser, Glu ou Gln⁺.

De manière avantageuse, l'un au moins de Xaa ou Xab représente Leu, Glu, Trp ou Ile.

Par référence à la séquence d'HPPD de *Pseudomonas*, les acides aminés mutés sont
20 choisis parmi les acides aminés suivants : Pro215, Gly298, Gly332, Phe333 Gly334 Gly336 et Asn337, plus préférentiellement les acides aminés Pro215 et Gly336.

Parmi les exemples de mutations préférées, on citera les mutations suivantes Pro215Leu, Gly336Glu, Gly336Trp ou Gly336Ile.

Il est entendu que les mutations décrites ci-dessus peuvent être combinées deux à
25 deux, comme par exemple une double mutation des acides aminés Gly334 et Gly336.

La présente invention concerne également une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD mutée décrite ci-dessus. Selon la présente invention, on entend par « séquence d'acide nucléique » une séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin, qu'elle soit d'origine naturelle ou
30 synthétique, notamment une séquence d'ADN pour laquelle les codons codant pour l'HPPD mutée selon l'invention auront été optimisés en fonction de l'organisme hôte dans lequel elle sera exprimée, ces méthodes d'optimisations étant bien connues de l'homme du

métier.

La séquence codant pour une HPPD d'origine non mutée, peut être d'origine quelconque. En particulier elle peut être d'origine bactérienne. Comme exemples intéressants on peut citer des bactéries du type *Pseudomonas sp*, par exemple *Pseudomonas fluorescens* ou encore des cyanobactéries du type *Synechocystis*. La séquence peut être aussi d'origine végétale, notamment issu de plantes dicotylédones telles que tabac, *Arabidopsis*, d'ombellifères telles que *Daucus carotta* ou encore monocotylédones telles que le *Zea mais* ou le blé ou bien encore l'orge. Les séquences codantes et le moyen de les isoler et cloner sont décrits dans les références citées auparavant, dont le contenu est

5
10

incorporé ici par référence.

La mutation pourra être effectuée dans la séquence d'acide nucléique codant pour l'HPPD d'origine non mutée par tout moyen approprié pour remplacer dans ladite séquence le codon codant pour l'acide aminé muté par le codon correspondant à l'acide aminé venant le remplacer, lesdits codons étant largement décrits dans la littérature et bien

15

connus de l'homme du métier.

Plusieurs procédés de la biologie moléculaire permettent de réaliser cette mutation.

Un premier procédé consiste à soumettre des cultures de cellules à une pression de sélection longue avec un inhibiteur de l'HPPD, en présence ou non d'un agent mutagène, le gène de l'HPPD mutant alors spontanément sous l'effet de cette pression de sélection, et

20

éventuellement de l'agent mutagène, ledit gène ayant évolué de telle sorte qu'il code pour une enzyme mutée permettant l'expression de l'activité HPPD dans des conditions où l'enzyme non modifiée est inhibée en partie ou en totalité. Les cellules peuvent être des cellules végétales ou des bactéries, et dans ce deuxième cas, elles peuvent exprimer une HPPD native (d'origine bactérienne) ou une HPPD d'une autre origine (bactérienne, champignons, algues, plantes), introduite dans la bactérie employée pour la mutagenèse

25

sous une forme appropriée permettant l'expression de cette HPPD, le gène codant pour l'HPPD native de ladite bactérie ayant été de préférence supprimé s'il existe. De tels moyens de transformation des bactéries sont bien connus de l'homme du métier, abondamment décrits dans la littérature, de même que les moyens de mutation

30

(notamment : Sambrook & al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Dans le cas où la cellule est une cellule végétale exprimant une HPPD native, l'HPPD mutée peut être isolée et clonée, ou encore des plantes peuvent être régénérées à partir des cultures cellulaires selon les méthodes usuelles. Les plantes ainsi obtenues expriment alors une HPPD mutée fonctionnelle moins sensible aux inhibiteurs d'HPPD
5 que l'HPPD native. Les méthodes de régénérations sont abondamment décrites dans la littérature (y compris dans les références citées précédemment) et bien connues de l'homme du métier.

La sélection des cellules présentant une HPPD mutée moins sensible aux inhibiteurs d'HPPD est effectuée au moyen d'un outil de criblage approprié. Au regard de l'objet de la
10 présente invention et de la solution recherchée, une HPPD moins sensibles aux inhibiteurs d'HPPD, un outil de criblage simple à mettre en œuvre consiste à déterminer les doses d'inhibiteur d'HPPD qui inhibent à 100 % les HPPD d'origine non mutées, létale pour les cellules exprimant cette HPPD non mutée, de soumettre les cellules après mutation à cette dose déterminée, d'isoler les cellules mutées ayant résistées à cette dose létale, puis d'isoler
15 et de cloner le gène codant pour l'HPPD mutée.

Cette opération de mutagenèse par culture cellulaire a été effectuée sur un nombre très important de cellules de *Pseudomonas* exprimant leur HPPD native (voir notamment les exemples particuliers décrits plus loin). Dans tous les cas, les mutants isolés par la méthode de sélection définie ci-dessus ont été des mutants présentant une mutation dans la
20 partie C-terminale de l'HPPD.

Un autre procédé de préparation d'une séquence d'acide nucléique mutée selon l'invention, et de la protéine correspondante consiste à effectuer une mutagenèse dirigée sur un ou plusieurs acides aminés sélectionnés à l'avance, par exemple en identifiant les acides aminés communs à plusieurs séquences dans la partie C-terminale, ou encore en
25 cherchant à reproduire dans une HPPD d'une origine déterminée, une mutation obtenue par mutagenèse au hasard (culture de cellule) dans une HPPD d'une autre origine. Les moyens d'obtenir ces mutations dirigées sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature (notamment : Directed Mutagenesis : A Practical Approach, 1991, Edited by M.J. McPHERSON, IRL PRESS), ou pour lesquels on peut employer des kits
30 commerciaux (par exemple l'U.S.E. Mutagenesis Kit de la société PHARMACIA). Dans tous les cas, il est utile d'employer après cette mutagenèse dirigée la même méthode de

sélection des HPPD mutées moins sensibles que l'HPPD non mutée correspondante employée pour la mutagenèse au hasard décrite ci-dessus.

La présente invention concerne donc également un procédé de préparation d'une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD mutée selon l'invention; ledit procédé
5 étant défini ci-dessus.

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD mutée selon l'invention dans un procédé pour la transformation des plantes, comme gène marqueur ou comme séquence codante permettant de conférer à la plante une tolérance aux herbicides inhibiteurs d'HPPD. Cette séquence peut bien entendu
10 également être utilisée en association avec d'autre(s) gène(s) marqueur(s) et/ou séquence(s) codante(s) pour une ou plusieurs propriétés agronomiques.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les
15 cellules végétales ou les plantes, la séquence codante comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD mutée telle que définie précédemment.

Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être introduit, pour la production d'HPPD mutée. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de
20 levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, de champignons, en particulier *Aspergillus*, d'un baculovirus, ou de préférence des cellules végétales et des plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que
25 des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le
30 tabac, le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression de la séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD sont bien connus de l'homme du métier en fonction de

l'organisme hôte. Ils comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

5 L'invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple
10 un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698, ou un promoteur d'actine de riz, d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), ou encore des promoteurs dits lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante, ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé.

15 Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed.

20 Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, on emploie en 5' de la
25 séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD mutée, une séquence d'acide nucléique codant pour un peptide de transit, cette séquence étant disposée entre la région promotrice et la séquence codante pour l'HPPD mutée de manière à permettre l'expression d'une protéine de fusion peptide de transit/HPPD mutée, cette dernière étant définie précédemment. Le peptide de transit permet d'adresser l'HPPD mutée dans les plastides, plus
30 particulièrement les chloroplastes, la protéine de fusion étant clivée entre le peptide de transit et l'HPPD mutée au passage de la membrane des plastides. Le peptide de transit peut être simple, comme un peptide de transit d'EPSPS (décrit dans le brevet US 5,188,642) ou

un peptide de transit de celui de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (ssu RuBisCO) d'une plante, éventuellement comprenant quelques acides aminés de la partie N-terminale de la ssu RuBisCO mature (EP 189 707) ou encore un peptide de transit multiple comprenant un premier peptide de transit de plante fusionné à une partie de la
5 séquence N-terminale d'une protéine mature à localisation plastidiale, fusionnée à un deuxième peptide de transit de plante tel que décrit dans le brevet EP 508 909, et plus particulièrement le peptide de transit optimisé comprenant un peptide de transit de la ssu RuBisCO de tournesol fusionné à 22 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la ssu RuBisCO de maïs fusionnée au peptide de transit de la ssu RuBisCO de maïs tel que décrit
10 avec sa séquence codante dans le brevet EP 508 909.

La présente invention concerne également la protéine de fusion peptide de transit/HPPD mutée, les deux éléments de cette protéine de fusion étant définis plus haut.

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins un gène chimère tel que
15 défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de répllication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.
20 Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

25 L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins une séquence d'acide nucléique ou un gène chimère tels que définis ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le
30 vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série

de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*. D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG. L'homme du métier
5 fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les organismes hôtes, en particulier cellules végétales ou plantes, transformés et contenant un gène chimère comprenant une séquence codante pour une HPPD mutée définie ci-dessus.

10 La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment
15 les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725,
20 WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes transformées pouvant être obtenues selon l'invention peuvent être du
25 type monocotylédones telles que par exemple les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs ou dicotylédones comme par exemple le tabac, la soja, le colza, le coton, la betterave, le trèfle, etc.

L'invention a aussi pour objet un procédé de désherbage sélectif de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un inhibiteur de l'HPPD notamment un herbicide défini
30 auparavant, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes transformées selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

La présente invention concerne également un procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ comprenant des graines ou des plantes transformées avec le gène chimère selon l'invention, lequel procédé consiste à appliquer dans la dite surface du champ une dose toxique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les graines ou plantes transformées avec le dit gène chimère selon l'invention.

La présente invention concerne également un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention avec un gène chimère selon l'invention lequel procédé consiste à semer les graines des dites plantes transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une dose toxique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour cible l'HPPD défini ci-dessus en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

Dans les deux procédés ci-dessus, l'application de l'herbicide ayant pour cible l'HPPD peut être faite selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

Par herbicide au sens de la présente invention on entend une matière active herbicide seule ou associée à un additif qui modifie son efficacité comme par exemple un agent augmentant l'activité (synergiste) ou limitant l'activité (en anglais safener). Les herbicides inhibiteurs d'HPPD sont en particulier définis auparavant. Bien entendu, pour leur application pratique, les herbicides ci-dessus sont associée de manière en soi connue aux adjuvants de formulations utilisés habituellement en agrochimie

Lorsque la plante transformée selon l'invention comprend un autre gène de tolérance à un autre herbicide (comme par exemple un gène codant pour une EPSPS mutée ou non conférant à la plante une tolérance au glyphosate), ou lorsque la plante transformée est naturellement insensible à un autre herbicides, le procédé selon l'invention peut comprendre l'application simultanée ou décalée dans le temps d'un inhibiteur d'HPPD en association avec ledit herbicide, par exemple le glyphosate.

L'invention a encore pour objet l'utilisation du gène chimère codant pour une HPPD mutée comme gène marqueur au cours du cycle "transformation-régénération" d'une espèce végétale et sélection sur l'herbicide ci-dessus

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al, publiés par Greene Publishing Associates et Wiley -Interscience (1989) ou dans Molecular cloning, T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook, 1982.

Exemple 1 : Test de criblage colorimétrique de mutants présentant une tolérance à la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione

pRP C : Le vecteur pRP A (décrit dans la demande WO 96/38567) contenant un fragment d'ADN génomique et la région codante du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 a été digéré par NcoI, purifié puis ligué dans le vecteur d'expression pKK233-2 (Clontech) lui-même digéré par NcoI, site de clonage unique de ce vecteur. L'orientation du gène dans le vecteur pRP C ainsi obtenu, permettant l'expression sous le contrôle du promoteur *trc* a été vérifiée.

Un milieu de culture de type YT broth à 1% d'agarose (ultra pur Gibco BRL) et à 5mM de L-Tyrosine (Sigma), et contenant l'agent de sélection du vecteur pRP C ci-dessus est dispensé en plaque de 96 puits à raison de 100ul par puits. 10ul d'une culture de E.Coli en phase exponentielle de croissance contenant le vecteur pRP C sont dispensés dans chaque puits. Après 16 heures à 37°C, les puits ne contenant que le milieu de culture ou ceuxensemencés avec une culture d'E.Coli contenant le vecteur PKK233-2 sont translucides, alors que les puitsensemencés avec une culture de E.Coli contenant le vecteur pRP C sont de couleur brune.

Une gamme a été réalisée avec milieu de culture identique contenant des concentrations variables (0mM à 14mM) du 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-

4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione (EP 0 496 631) solubilisé dans l'eau et amené à pH7,5. Cette molécule est un dicétonitrile, reconnu comme étant un inhibiteur efficace d'activité HPPD (Pallett, K.E. et al 1997. Pestic. Sci. 50, 83-84). On observe une absence totale de coloration pour la culture bactérienne contenant le vecteur pRP C à 7mM du composé ci-dessus.

Des mutants d'HPPD obtenus par mutagenèse dirigée aussi bien que par mutagenèse au hasard ont été sélectionnés par brunissement du milieu contenant du 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione à la concentration de 7mM comme cela sera montré ci-après.

Des résultats identiques ont été obtenus en substituant, à la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthyl-4-trifluorométhylphényl)propan-1,3-dione, la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl -4-(méthylthio) phényl) propan-1,3-dione, et la 2-(2-chloro-3-ethoxy-4-(éthylsulfonyl) benzoyl)-5-méthyl-1,3-cyclohexadione,(WO 93/03009). utilisées respectivement à 3,5mM et 7mM.

Ces résultats confirment qu'un test basé sur l'activité HPPD quelle que soit l'origine de cette activité, permet d'identifier des activités HPPD présentant une tolérance à des inhibiteurs d'activité HPPD de famille des isoxazoles aussi bien que des tricétones.

Exemple 2: Mutagenèse au hasard du gène de l'HPPD de *Pseudomonas*

fluorescens A32 à l'aide de l'hydroxylamine.

L'ADN plasmidique d'une culture de *E.Coli* contenant le vecteur pRP C décrit ci-dessus a été extrait en utilisant le protocole standard. Cet ADN a été mis en présence d'hydroxylamine, agent chimique mutagène provoquant la substitution de la Cytosine en Thymidine, pendant une heure à 80°C, en utilisant un protocole standard. La souche DH10B de *E.Coli*. K12 a été transformée avec l'ADN plasmidique potentiellement muté ainsi obtenu. L'utilisation du test de criblage colorimétrique décrit dans l'exemple 1 a permis d'identifier après criblage de plusieurs milliers de clones potentiellement mutés plusieurs colonies capables de brunir le milieu, c'est à dire de transformer l'HPP en homogénisate même en présence de 7mM de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione .

Après séquençage de ces divers mutants il s'est révélé que l'utilisation de cet outil de mutagenèse/criblage a permis d'isoler 4 mutants distincts correspondants à trois sites de mutations. distincts:

- Premier site: la proline 215 remplacée par une leucine, mutant appelé Pfl215
- 5 - Deuxième site:
 - la glycine 334 remplacée par une sérine, mutant appelé Pfs334
 - la glycine 334 remplacée par un acide aspartique, mutant appelé Pfd334
- Troisième site: la glycine 336 remplacée par un acide sérine, mutant appelé Pfs336

10 Ces trois sites mutés permettant d'obtenir une tolérance améliorée par rapport à l'HPPD non mutée sont situés dans la partie C-terminale de la protéine.

Les clones dérivés du clone pRP C contenant la région codante du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 contenant une ou plusieurs mutations sont nommés pRP C suivi du nom de la ou des mutations effectuées, comme par exemple pRP C Pfl215 ou
15 pRPC Pfs336 (ou encore simplement par la seule désignation de l'acide aminé muté, comme par exemple Pfl215 ou Pfs336, sauf indication contraire quant à l'origine de l'HPPD mutée).

La ou les modifications par mutagenèse au hasard peuvent être effectuées sur toute protéine ayant une activité de type HPPD c'est à dire transformant le 4-hydroxy
20 phénylpyruvate en homogentisate, dont la région codante est ou pourrait être clonée. Les HPPD décrites dans ce texte sont entre autres celle de *P. fluorescens*, *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Zea mais* et *Synechocystis*, mais bien sûr il est évident pour l'homme de métier que toutes ces modifications sont applicables aux autres HPPD.

25 **Exemple 3: Mutagenèse dirigée du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 par analogie de séquence.**

Par alignement des séquences protéiques des HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32, *Arabidopsis thaliana*, de souris de cochon et de *Coccicoides*..., il est possible de choisir parmi les acides aminés que l'on retrouve conservés dans différentes séquences un
30 certain nombre d'entre eux pour les mutagéniser et obtenir des HPPD tolérantes; on aurait pu ajouter à l'alignement, présenté en figure 1, des séquences d'autres HPPD décrits dans la littérature.

L'alignement de ces différentes séquences met nettement en évidence qu'une des régions les mieux conservées est située entre la glycine en position 332 et la phénylalanine 342. Non seulement cette région est très conservée mais en plus elle englobe les deux glycines en position 334 et 336 identifiées par mutagenèse au hasard (en gras sur l'alignement de séquences et marqués d'une étoile). On a réalisé la mutagenèse sur le vecteur pRP C en utilisant l'U.S.E. Mutagenesis Kit, Pharmacia. Les oligonucléotides M-ont été utilisés pour les mutagenèses de la phénylalanine 333, de la glycine 334, de la glycine 336 et de l'asparagine 337, mais aussi pour celles des doubles mutants des glycines 334 et 336, comme indiqué dans les schémas ci-après (identificateurs de séquences en annexe, SEQ ID NO 1 à 12) :

Mutagenèse de PHE333, remplacée uniquement par Trp

Oligo 1 : GAAGTTGCCC TCGCCCCACC CATCGTCGCC CTT

Mutagenèse de PHE333, remplacée uniquement par LEU & ILE

Oligo 2 : GAAGTTGCCC TCGCCRAKCC CATCGTCGCC CTT

Mutagenèse de GLY334, remplacée uniquement par TRP

Oligo 3 : CTTGAAGTTG CCCTCCCAA ACCCATCGTC GCC

Mutagenèse de GLY334, remplacée uniquement par ASP

Oligo 4 : CTTGAAGTTG CCCTCGTCAA ACCCATCGTC GCC

Mutagenèse de GLY334, remplacée uniquement par SER

Oligo 5 : CTTGAAGTTG CCCTCGCTAA ACCCATCGTC GCC

Mutagenèse de GLY334, remplacée uniquement par LEU & ILE

Oligo 6 : CTTGAAGTTG CCCTCRAKAA ACCCATCGTC GCC

Mutagenèse de GLY336, remplacée uniquement par ASP

Oligo 7 : CAGCGCCTTG AAGTTGTCCT CGCCAAACCC ATC

Mutagenèse de GLY336, remplacée uniquement par GLU

Oligo 8 : CAGCGCCTTG AAGTTYTCCT CGCCAAACCC ATC

Mutagenèse de GLY336, remplacée uniquement par TRP

Oligo 9 : CAGCGCCTTG AAGTTCCACT CGCCAAACCC ATC

Mutagenèse de GLY336, remplacée uniquement par Ile

Oligo 10 : CAGCGCCTTG AAGTTDACTC GCCAAACCCA TC

Mutagenèse de GLY334 & GLY336, remplacées par tous les autres acides aminés, donc avec possibilité d'obtenir un double mutant

Oligo 11 : CGCTTGAAGT TNNNCTCNNN AAACCCATCG TC

Mutagenèse de ASN337, remplacée uniquement par LEU & ILE

Oligo 12 : GAACAGCGCC TTGAARAKGC CCTCGCCAAA CCC

Après criblage avec la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione de plusieurs centaines de mutants potentiels, on a identifié 15 nouveaux mutants, dont 12 simples mutants et 3 doubles mutants (Voir tableau récapitulatif), présentant une tolérance à l'inhibiteur 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione dans notre test de détection colorimétrique. Il faut ajouter que certains des mutants identifiés au cours de ces mutagenèses dirigées sont identiques bien sûr aux mutants identifiés dans l'exemple 2 (comme par exemple PfS334 et de PfD334).

Il a été possible de combiner des mutations, non seulement dans des régions proches, comme c'est le cas pour obtenir des double mutants en position 334 et 336, mais aussi dans des régions éloignées comme c'est le cas pour obtenir des double mutants en position 215 et 336, comme indiqué ci-après.

pRP C Pfl215 Delta : L'ADN plasmidique du clone pRP C Pf L215 a été digéré PstI, purifié puis reliqué. Le premier site PstI se situant au niveau de la Leucine 289, et le dernier site PstI se situant dans le site de clonage multiple du PKK233.2, le clone obtenu pRPC Pfl215 Delta, contient la partie de la séquence codante de l'HPPD Pf L215 incluant la mutation Pro215Leu, mais pas la partie terminale ni la partie génomique.

PRP C Pfl215 W336, PRP C Pfl215 E336, PRP C Pfl215 I336 :

Les ADN plasmidiques des clones pRP CPfW336, pRP CPfE336, pRP CPfI336, ont été digérés par MluI et HindIII, MluI se situant dans la partie codante de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens*, au niveau de l'acide aspartique 254, HindIII se situant dans le site de clonage multiple du PKK223.3. Les fragments contenant les parties C-terminales des HPPD mutées ainsi que la partie génomique, ont été purifiées, puis liguées dans le plasmide pRP C Pfl215 Delta, digéré par MluI et HindIII. Les trois clones ainsi obtenus sont équivalents au clone pRP C Pfl215, mais contiennent respectivement aussi la mutation W336, E336 et I336.

Les mutants obtenus sont identifiés comme suit:

Simple mutants:

Phénylalanine333 remplacé par tryptophane appelé PfW333

	Phenylalanine333 remplacé par leucine	appelé Pfl333
	Glycine334 remplacé par tryptophane	appelé Pfw334
	Glycine334 remplacé par proline	appelé Pfp334
	Glycine334 remplacé par leucine	appelé Pfl334
5	Glycine334 remplacé par Isoleucine	appelé Pfl334
	Glycine336 remplacé par acide aspartique	appelé Pfd336
	Glycine336 remplacé par glutamine	appelé Pfq336
	Glycine336 remplacé par acide glutarique	appelé Pfe336
	Glycine336 remplacé par tryptophane	appelé Pfw336
10	Glycine336 remplacé par isoleucine	appelé Pfl336
	Asparagine337 remplacé par leucine	appelé Pfl337

Doubles mutants obtenus par mutagenèse dirigée:

	Glycine334 remplacé par alanine et	
15	Glycine336 remplacé par alanine	appelé Pfa334-A336
	Glycine334 remplacé par alanine et	
	Glycine336 remplacé par arginine	appelé Pfa334-R336
	Glycine334 remplacé par serine et	
	Glycine336 remplacé par arginine	appelé Pfs334-R336

20

Doubles mutants obtenus par clonage:

	Proline 215 remplacé par Leucine et	
	Glycine 336 remplacé par Tryptophane	appelé Pfl215-W336
	Proline 215 remplacé par Leucine et	
25	Glycine 336 remplacé par Acide Glutamique	appelé Pfl215-E336
	Proline 215 remplacé par Leucine et	
	Glycine 336 remplacé par Isoleucine	appelé Pfl215-I336

30 Ce résultat montre qu'il est possible, par mutagenèse des acides aminés conservés entre les séquences protéiques de différentes HPPD situés dans la partie C-terminale de la protéine, d'obtenir des HPPD présentant une tolérance aux inhibiteurs d'activité HPPD. Donc toute région conservée entre différentes séquences en acides aminés d'HPPD est une

bonne cible pour obtenir des mutants qu'il est intéressant d'analyser pour déterminer leur tolérance. Il est clair que fait partie de l'invention toute mutation ou mutation multiple qui permettrait d'obtenir une HPPD tolérante même si cette protéine n'est pas exemplifiée dans ce texte.

5 Il est là aussi démontré que le domaine C-terminal est bien la cible privilégiée de la mutagenèse d'une HPPD en vue d'une bonne tolérance de l'enzyme à ces différents inhibiteurs. En effet dans le domaine N-terminal défini comme allant de l'acide aminé n°1 au peptide de liaison défini précédemment chez *Pseudomonas fluorescens* A32 ou à ces correspondants dans les HPPD d'autres espèces il est très difficile de définir une région
10 conservée.

La ou les modifications, par mutagenèse dirigée à partir d'informations déduites d'un alignement de séquence, peuvent être faites sur toute protéine ayant une activité de type HPPD c'est à dire transformant le 4-hydroxyphénylpyruvate en homogentisate, dont la région codante est ou pourrait être clonée. Les HPPD décrites dans ce texte sont entre
15 autres celle de *P. fluorescens*, *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Zea mais* et *Synechocystis*, mais bien sûr il est évident que toutes ces modifications sont applicables aux autres HPPD.

Exemple 4: Mutagenèse dirigée du gène de l'HPPD de *Pseudomonas*
20 ***fluorescens* A32.**

Les résultats obtenus par mutagenèse au hasard comme décrit à l'exemple 2, ainsi que de ceux obtenus après alignement des différentes séquences d'HPPD, montrent clairement que le peptide allant de F#333 à F#338 (numérotation sur HPPD de *P. fluorescens*) est une région particulièrement intéressante en terme de mutagenèse pour
25 obtenir une tolérance.

Parallèlement à cette information, on a découvert, par une analyse de la structure tridimensionnelle de l'enzyme de *Pseudomonas fluorescens* strain A32 par exemple (figure 1), que la partie C-terminale de la protéine, de son monomère contient le site catalytique de l'enzyme. Ce sont donc les acides aminés de ce domaine C-terminal qu'il faut mutagéniser
30 en priorité pour espérer modifier l'interaction protéine inhibiteur et obtenir ainsi une enzyme plus tolérante.

On a donc recherché, par analyse de la structure tridimensionnelle de la protéine HPPD de *P. fluorescens*, des mutations ponctuelles qui pourraient entraîner un changement conformationnel de l'hexapeptide Phe333 à Phe338 sans muter directement ce peptide. L'idée directrice est que la mutation d'un acide aminé assez éloigné du site actif, un acide aminé non conservé peut influencer le positionnement dans l'espace de ce peptide de Phe333 à Phe338 et donc induire une tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD par effet "ricochet".

On a donc recherché dans la structure des acides aminés proches de cet hexapeptide; un petit nombre d'acides aminés répondent à ce critère, comme l'acide aspartique 287 et la glycine 298 [pour information, l'atome de carbone alpha de la glycine 334 de l'hexapeptide est à 9,61 angström de celui du fer situé dans le site catalytique et le carbone alpha la glycine 298 est à 5,75 angström de celui de la glycine 334]. Cette glycine 298 a paru être des deux acides aminés le meilleur candidat car toute mutagenèse va conduire à un acide aminé avec une chaîne latérale plus grosse et on a remplacé cette glycine par un acide glutamique (dont la chaîne latérale est en outre chargée négativement) en vue d'une modification suffisamment sensible pour que l'effet soit visible.

De plus quand on mute la glycine 298 par un acide glutamique, la chaîne latérale de cet acide glutamique qui est très encombrée 'cogne' sur la structure secondaire en feuillet Beta dans laquelle on trouve le motif conservé LLQIF. La phénylalanine 312 de ce motif se trouve elle même très proche du fer.

On a testé la mutation Gly298 en Glu298.

Cette mutations Gly298 en Glu298 a été créée par mutagenèse dirigée (U.S.E. Mutagenesis Kit, Pharmacia) du vecteur pRP C en utilisant l'oligonucléotide n° 13 (identificateur de séquence en annexe - SEQ ID NO 13) :

GLY298 remplacé par acide glutamique

Oligo 13 : GCCTTCCACGGAAGATTCGTCCAGCAGGATACC

Ce mutant appelé PfE298 provoque le brunissement du milieu de criblage contenant 7mM de RPA202248 (Voir tableau récapitulatif).

Ceci confirme qu'avec la connaissance de la structure tridimensionnelle de l'HPPD, on peut déterminer un certain nombre de mutations efficaces en terme de tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD, qu'elle soit d'origine bactérienne végétale ou autre. En effet il est

5 tout à fait possible de modéliser la structure de n'importe quelle HPPD dont on a la séquence protéique puisque on connaît la structure précise dans le cas de l'HPPD de *P. fluorescens*. Cette modélisation sera surtout intéressante dans le cas de la modélisation du domaine C-terminale, le mieux conservé en terme de séquence primaire et surtout le plus prometteur en terme de tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD.

10 La ou les modifications, par mutagenèse dirigée à partir d'informations déduites de la structure tridimensionnelle d'une HPPD modélisée ou déterminée par analyse de cristaux obtenus en présence ou en absence d'un inhibiteur, peuvent être faites sur toute protéine ayant une activité de type HPPD c'est à dire transformant le 4-hydroxyphénylpyruvate en homogentisate, dont la région codante est ou peut être clonée. Les HPPD décrites dans la présente demande sont entre autres celle de *P. fluorescens*, *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Zea mais* et *Synechocystis*, mais bien sûr il est évident pour l'homme de métier que toutes ces modifications sont applicables aux autres HPPD.

15 **Exemple 5: Expression d'HPPD mutantes de *Pseudomonas fluorescens* dans le tabac**

A) Construction de gènes chimères.

20 pRP-VB3 : L'ADN du vecteur binaire pBI121 (Clontech) a été digéré HindIII et XbaI, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la pfu polymérase (Stratagène), le vecteur purifié. L'ADN du clone pRP-S décrit à l'exemple 2 de la demande dans la demande PCT 96/38567 et comprenant l'enchaînement " promoteur double histone - TEV - OTP - gène HPPD - terminateur Nos" a été digéré HindIII et SacI, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la pfu polymérase (Stratagène), l'insert purifié puis ligué dans le vecteur purifié précédemment décrit. L'orientation a été vérifiée par digestion

25 Sall. Le clone pRP-VB3 a donc la structure de gène chimérique suivante :

RB / promoteur Nos / NPTII / terminateur Nos / promoteur double histone / tev / otp / HPPD / terminateurNos / LB

RB LB = bordure droite et gauche respectivement du T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens*

30 promoteur Nos = promoteur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*

NPTII = séquence codante de la néomycine phosphotransferase de type II (conférant la résistance à la kanamycine)

terminateur NOS = séquence terminatrice de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*

promoteur double histone = décrit dans EP 507 689

tev = TEV enhancer (Carrington & Freed)

- 5 otp = peptide de transit optimisé (EP 508 909)

pRP-VB3-b : L'ADN du clone pRP-VB3 a été digéré par BamHI purifié, puis ligué dans le vecteur pZERO-1 (Invitrogen) qui ne contient pas les sites de restriction BstEII et Sall, digéré BamHI et purifié. Une partie de l'OTP, le gène de l'HPPD et le terminateur Nos sont ainsi transférés dans pZERO-1.

- 10 pRP-VB3-c : L'ADN du clone pRPVB3-b a été digéré Sall, purifié, puis ligué en présence de l'adaptateur présenté ci-dessous (oligonucléotides 14 et 15 - SEQ ID NO 14 et 15 en annexe), de façon à remplacer le site de restriction Sall par le site BstEII.

5' TCGAGAGAGAGGTGACCGAGAGA 3'
3' CTCTCTCCACTGGCTCTCTAGCT 5'

- 15 pRP-VB3-d : L'ADN du clone pRP-VB3-c a été digéré BamHI, l'insert purifié, puis cloné dans le vecteur PUC19 (Biolabs) digéré BamHI. Une partie de l'OTP, le gène de l'HPPD et le terminateur Nos sont ainsi transférés dans PUC19.

- pRP-VB3-e : Le vecteur PUC19 ne possédant pas les sites de restriction PmlI et StuI, l'ADN du clone pRP-VB3-d a été digéré PmlI et StuI, purifié, puis ligué sur lui-même permettant ainsi de supprimer le site Not dans le gène de l'HPPD et de tronquer la
20 partie codante de l'HPPD de 500 paires de bases environ, afin de rendre aisé par la suite, le criblage des colonies transformées ayant intégré les HPPD mutantes.

- pRP-VB3-f : Le vecteur pRP-VB3-e a été digéré NotI, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la Pfu polymérase (Stratagène), purifié, digéré BamHI, purifié,
25 puis cloné dans le vecteur PUC19 digéré KpnI, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la Pfu polymérase (Stratagène), purifié, digéré BamHI, purifié.

pRP-VB83-g : L'ADN du clone pRP-VB3 a été digéré BstEII, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la Pfu polymérase (Stratagène), le vecteur purifié puis ligué sur lui-même permettant ainsi la disparition du site unique BstEII de ce vecteur.

- 30 pRP-RD224 : L'ADN du clone pRP-VB3-f a été digéré BamHI et SacI, purifié, puis ligué dans le vecteur pRP-VB3-g digéré par BamHI et SacI et purifié. Le clone pRP-RD224 a donc la structure suivante :

RB / promoteur Nos / NPTII / terminateur Nos / promoteur double histone / tev / otp /
HPPD tronquée / terminateur Nos / LB

5 pRP-RD224mutants : Les ADN des vecteurs portant les HPPD mutées ainsi que l'HPPD non mutée contenues dans le vecteur PKK233-2, ont été digérés par KpnI et BstEII, purifiées puis liguées dans le vecteur pRP-RD224, digéré par KpnI et BstEII et purifié. Les transformants ayant intégré le gène de l'HPPD muté ont été sélectionné pour la taille de l'insert par digestion KpnI et BstEII. Les clones obtenus sont notés pRP-RD224
10 auquel on ajoute le type de mutation effectuée sur l'HPPD, on a ainsi créé par exemple pRP RD224 Pf (pour l'enzyme non mutée) pRP RD224 PfD336 (pour l'enzyme avec un acide aspartique en 336), pRP RD224 PfQ336 (pour l'enzyme avec une glutamine en 336), pRP RD224 Pfl333 (pour l'enzyme avec une leucine en 333), pRP RD224 PfA334-A336 (pour l'enzyme avec une alanine en 334 et en 336, double mutant).

15 **B) Transformation du Tabac "Petit havana".**

Les gènes chimères décrits précédemment ont été transférés dans du tabac "Petit havana" selon les procédures de transformation et de régénération déjà décrites dans la demande européenne EP n° 0 508 909.

20 **1) Transformation:**

Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA101.

25 **2) Régénération:**

La régénération du tabac "Petit havana" à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que
25 350mg/l de céfotaxime et des doses variables de la 2-cyano-1-[4-(méthylsulphonyl)-2-trifluorométhylphényl]-3-(1-méthylcyclopropyl)propan-1,3-dione (EP 496630) , 10ppm, 20ppm, 40ppm qui est un analogue de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione ou directement des doses de 2 ou 4 ou 8 ppm de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione .
30 Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre et transformés selon la technique des disques foliaires (Science 1985, Vol 227, p1229-1231) en trois étapes successives :

- la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose contenant 0.05mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours et des doses variables d'herbicide, la 2-cyano-1-[4-(méthylsulphonyl)-2-trifluorométhylphényl]-3-(1-méthylcyclopropyl)propan-1,3-dione(EP 496630) ou la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione).

- Les pousses vertes formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose et des doses variables d'herbicide, mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours.

10 - Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et des doses variables d'isoxaflutole et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

C) Mesure de la tolérance à l'herbicide des plantules *in-vitro* .

15 Les expériences sont réalisées par action d'un agent de sélection avec les mutants indiqués dans le tableau suivant et montrent que si l'on n'obtient pas de pousses/plantules aux doses les plus élevées d'herbicide dans les essais de transformation/régénération avec une HPPD non mutée, par contre les mutants permettent grâce à une meilleure tolérance de l'enzyme d'obtenir des plantules même à des doses élevées de 2-cyano-1-[4-(méthylsulphonyl)-2-trifluorométhylphényl]-3-(1-méthylcyclopropyl)propan-1,3-dione(EP 20 496630) ou de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluoro méthylphényl) propan-1,3-dione des plantules (voir tableau récapitulatif). Ces plantules obtenues à fortes concentration de l'agent de sélection avec une HPPD mutée et que l'on ne peut obtenir avec l'HPPD sauvage sont tout à fait normales.

25

Au cours de la sélection in-vitro sur 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione à 1ppm, 2ppm, 4ppm et 8ppm, il apparaît qu'un certain nombre de mutants ne permettent pas la régénération aisée de plantules de tabac transformées, quelque soit la dose d'herbicide employée. On notera toutefois que des 30 transformants pourront être obtenus avec un plus grand nombre d'essais de transformation, et/ou en déterminant les concentrations d'agent de sélection.

Par contre avec d'autres mutants il est aisé d'obtenir des plantules vertes et donc tout à fait normales. Les mutants qui donnent le plus de plantules sont les mutants Pfl215, Pfd336 et PfQ336 (pour les mutants étudiés selon ce procédé).

Au cours de la transformation avec Pfd336,

- 5 il a été obtenu 25% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 1ppm,
il a été obtenu 25% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 2ppm,
il a été obtenu 35% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 4ppm,
il a été obtenu 15% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 8ppm.

Au cours de la transformation avec Pfl215,

- 10 il a été obtenu 8% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 1ppm,
il a été obtenu 60% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 2ppm,
il a été obtenu 8% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 4ppm,
il a été obtenu 24% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 8ppm.

Au cours de la transformation avec PfQ336,

- 15 il a été obtenu 35% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 1ppm,
il a été obtenu 25% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 2ppm,
il a été obtenu 40% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 4ppm,
il a été obtenu 0% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 8ppm.

Au cours de la transformation avec l'HPPD non mutée,

- 20 il a été obtenu 15% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 1ppm,
il a été obtenu 70% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 2ppm,
il a été obtenu 15% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 4ppm,
il a été obtenu 0% des événements de transformation tolérant la sélection faite à 8ppm.

- 25 Ces résultats viennent donc confirmer que les HPPD mutées sont statistiquement plus efficaces que l'HPPD sauvage; avec les deux mutants Pfd336 et Pfl215 il est possible d'obtenir des transformants à la dose la plus haute de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, alors que ce n'est pas possible avec l'HPPD non mutée.

- 30 De plus avec le mutant PfQ336, de nombreux événements de transformation sont obtenus à 4ppm de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl)

propan-1,3-dione, 40% des plantules, alors qu'avec l'HPPD sauvage un faible pourcentage des plantes sont obtenus à 4ppM de cet herbicide.

Tableau récapitulatif des mutants de l'HPPD de *P. fluorescens*

5	Type d'HPPD	Activité dans test de criblage*		% de plantules vertes obtenues à la
		avec une dose d'agent de sélection de		dose de x ppm d'herbicide
		0 mM	7mM	
	Sauvage	10	0	15% à 4ppm
10	Mutée			
	PfL215	10	7	24% à 8ppm
	PfE298	8	3	pas de plantules vertes
	PfL333	5	4	-
	PfW333	-	-	pas de plantules vertes
15	PfS334	7	7	pas de plantules vertes
	PfD334	1	1	-
	PfW334	6	6	-
	PfP334	5	5	pas de plantules vertes
	PfL334	5	4	pas de plantules vertes
20	PfI334	5	4	pas de plantules vertes
	PfS336	-	-	-
	PfD336	2	1	15% à 8ppm
	PfQ336	8	8	40% à 8ppm
	PfE336	10	8	-
25	PfW336	10	9	-
	PfI336	10	8	-
	PfL337	8	8	pas de plantules vertes
	PfA334-A336	8	8	-
	PfA334-R336	8	7	pas de plantules vertes
30	PfS334-R336	5	5	pas de plantules vertes

*: test de criblage décrit dans l'exemple 1.

'-' données non disponibles.

Le chiffre 10 correspond à une activité forte de même niveau que l'HPPD non mutée et sans inhibiteur, le chiffre 0 correspond à une activité nulle soit due à une inhibition complète par le 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhyl phényl) propan-1,3-dione soit due à une mutation entraînant la non activité de l'enzyme, les

chiffres 1 à 9 correspondent à des activités intermédiaires plus forte quand le chiffre augmente dans le test d'évaluation décrit dans l'exemple 1.

Ces résultats confirment que l'introduction d'une HPPD présentant une tolérance aux inhibiteurs d'activité HPPD dans les plantes, confère à celles-ci une tolérance à ces
5 même inhibiteurs, tolérance qui est donc meilleure que celle obtenue avec une HPPD non mutée.

D) Tolérance *in- vivo* .

Toutes les plantes, après enracinement, ont été acclimatées à la serre et menées à
10 graines.

Les graines de plusieurs capsules sont mélangées , puis semées sur un mélange de terreau et de sable, à raison de 100 graines environ par barquette de semis. Le génotype sauvage Petit Havana est inclus comme témoin. Les traitements sont effectués à raison de 600g/ha d'isoxaflutole formulé. Les notations d'aspect du semis sont réalisées 12 jours
15 après traitement, la note 5 pour le meilleur aspect, la note 1 pour le plus mauvais. Les moyennes des observations de plusieurs événements de transformation (10-20 événements de transformation par HPPD évaluée) sont représentatives des valeurs de tolérance en pré émergence de l'HPPD sauvage et des HPPD mutées.

Ces mesures effectuées pour plusieurs mutants d'HPPD de *Pseudomonas*
20 *fluorescens* sur les positions 336 et 215 permettent d'établir les valeurs moyennes de tolérance dans le tableau ci-après.

Essai	1	2
Pf non mutée	2,06	2,2
PfW336	-	2,8
PfD336	3,35	-
PfQ336	2,94	-
PfL215	3	-

Ces résultats montrent que les HPPD mutées selon l'invention présentent dans les
25 plantes transformées une tolérance aux herbicides inhibiteurs d'HPPD supérieure à la tolérance obtenue avec l'HPPD native correspondante.

Exemple 6 : Mutagenèse dirigée du gène de l'HPPD de *Synechocystis*.

On choisit un site de mutation efficace sur l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* en terme de tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD et on le transpose à une autre HPPD.

5 Cette transposition est faite à une HPPD la plus divergente possible de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* et des autres HPPD connues. Pour ce faire on travaille avec le gène codant pour l'HPPD de *Synechocystis* connue grâce au séquençage systématique du génome de cette cyanobactérie jamais cloné en tant que tel. On a donc d'abord isolé le gène puis on l'a fait exprimer dans *E. coli*.

10 1) obtention du gène.

L'ADN génomique de la cyanobactérie *Synechocystis* PCC6803 a été extrait et purifié en utilisant les protocoles standards. 200µg de cet ADN génomique ont été amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant 1,25U de *Taq* polymérase (Boehringer) dans son tampon dans un volume réactionnel de 50 µl avec 200µM de dNTP(désoxyribonucleotide-triphosphate). Les séquences des oligonucléotides synthétiques 16 et 17 (SEQ ID NO 16 et 17 en annexe) utilisés comme amorces ont été déduites de la séquence publiée dans Genbank de l'HPPD de *Synechocystis*.

Oligo 16 ATTATGGAAT TCGACTATCT T

Oligo 17 CAGTATTCAT AATGTTAATT ATG

20 Le programme d'amplification, 5 minutes 94°C, puis 50 cycles 1 minute 94°C, 1 minute 49°C, 1 minute 72°C, puis 5 minutes 72°C, a été réalisé sur un appareil Perkin-Elmer 9600.

2) Clonage du gène et expression.

25 Le fragment amplifié obtenu par PCR a été purifié, digéré EcoRI, repurifié, puis cloné dans le vecteur pTrc-99A (Pharmacia) préalablement digéré EcoRI et SmaI. La bactérie JM105 a été transformée par le plasmide recombinant. Le séquençage a permis de vérifier la conformité du fragment cloné avec la séquence de l'HPPD de *Synechocystis* publiée.

30 L'activité d'oxygénase de l'HPPD de *Synechocystis* ainsi obtenue a été observée par brunissement du milieu en utilisant le test colorimétrique décrit précédemment (cf exemple 1) avec ajout d'IPTG(isopropyl-β-D-thio-galactopyrazonide) à la concentration de 1mM afin d'induire l'expression de la protéine. Dans les mêmes conditions, sur un milieu

contenant 7mM de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, il n'y pas brunissement du milieu, ce qui confirme l'inhibition de l'activité HPPD de *Synechocystis* par le 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione .

5 3) Mutagenèse dirigée.

Par alignement des séquences protéiques de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 et de l'HPPD de *Synechocystis* PCC6803, on a estimé que les Glycines en position 334 et 336 de l'HPPD de *Pseudomonas* (glycines indiquées par des étoiles dans la figure de l'exemple 3 et qui sont très fortement conservées) sont en position 318 et 320 sur l'HPPD de *Synechocystis* (en gras sur l'alignement de séquences protéiques en figure 3)

Plusieurs mutants de la position 334 chez *Pseudomonas fluorescens* ayant été obtenus, deux expériences de mutagenèse dirigée (U.S.E., Pharmacia), utilisant les oligonucléotides MUGLYA et MUGLYB destinée à remplacer la Glycine 318 (de *Synechocystis* correspondant à la glycine 334 de *P. fluorescens*) soit en Asparagine ou en

15 Sérine, soit en Proline ou Alanine, ont été réalisées (SEQ ID NO 18 et 19).

GLY318, remplacement possible par SER & ASN

Oligo 18 CGGGCAAAAG GATTARCCA AGGAACTTT CAAG

GLY318, remplacement possible par PRO & ALA

20 Oligo 19 CGGGCAAAAG GATTSCNCA AGGAACTTT CAAG

Dans les deux expériences, des clones obtenus après mutagenèse ont provoqué le brunissement du milieu de criblage à 7mM de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione (test décrit dans l'exemple 1). Un mutant de chaque expérience a été séquencé.

25 Glycine318 remplacé par asparagine, appelé SyN318 similaire au PfD334 (dans exemple 3)

Glycine318 remplacé par alanine, appelé SyA318 similaire au PfA334 (dans exemple 3)

Ces résultats confirment que les mutations conduisant à une tolérance, mise en

30 évidence pour une HPPD donnée sont transposables à une autre HPPD, d'une autre espèce, d'un autre règne.

Ces résultats confirment aussi que des modifications de la séquence protéique dans la partie C-terminale d'une HPPD qu'elle que soit son origine (bactérienne ou autre) peuvent entraîner une tolérance améliorée aux inhibiteurs d'HPPD.

5 **Exemple7: Etude biochimique d'une HPPD mutée, mutants de *Synechocystis*.**

Les mutants SyN318 et SyA318 obtenus dans l'exemple précédent ont été étudiés, en comparaison avec l'HPPD non mutée de *Synechocystis* pour les caractéristiques biochimiques K_m et I_{50} vis à vis d'un inhibiteur de l'HPPD qui est le 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione. Cette analyse a été faite en utilisant le protocole suivant:

a) Mesure de l'activité

L'activité HPPD est mesurée en déterminant par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) la quantité de produit formé, c'est à dire d'homogentisate, après incubation de l'enzyme avec son substrat, l'HPP. L'injection de différentes doses d'homogentisate variant de 12 à 48 nmoles dans la colonne permettent de déterminer le temps de rétention de l'homogentisate et de corréler l'aire du pic avec la quantité de produit injecté.

Les mesures d'activité sont réalisées dans un volume final de 200 μ l contenant : de l'ascorbate à 12,6 mM, du fer ($\text{FeH}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2,6\text{H}_2\text{O}$) à 178 μ M (préalablement préparé dans du tampon Tris acétate 0,1 M pH 6), 50 μ g d'extrait brut contenant l'HPPD, de l'HPP à 352 μ M, et du tampon Tris acétate 0,1 M pH 7,5. L'enzyme est incubée 1 min à 30°C avec dans un premier temps le fer puis 5 min à 30°C avec l'ascorbate avant le démarrage de la réaction par ajout du substrat, l'HPP. L'incubation est poursuivie durant 1 min 30 à 30°C, puis la réaction est arrêtée par addition de 70 μ l d'acide perchlorique 20 %. Les protéines sont ensuite éliminées par centrifugation 5 min à 15300 rpm à 20°C. Le surnageant est récupéré. La quantité d'homogentisate formé est alors analysée par injection de 75 μ l de l'essai dans une colonne Pico Tag C18 connecté au système HPLC. L'élution est réalisée à un débit de 1ml/min. L'élution isochratique réalisée est la suivante: 1- 0% de tampon B (soit 100% de tampon A : eau, acétonitrile 3% (v/v), acide trifluoro acétique 0,1% (v/v)) durant 6 minutes ; 2- 100% de tampon B (acétonitrile 100%) jusqu'à la minute 11 ; 3- 0% de tampon B jusqu'à la minute 19. En sortie de colonne, l'homogentisate est

détecté par mesure de l'absorbance à 288 nm. La quantité de produit formé est définie par l'aire du pic sur le chromatogramme.

b) Détermination du K_M

Le K_M de l'HPPD pour l'HPP est déterminé en mesurant la vitesse initiale de la
5 réaction avec différentes concentrations d'HPP. Les réactions sont réalisées dans les
conditions décrites ci-dessus avec des concentrations d'HPP allant de 5,5 μM à 1400 μM .

c) Détermination de l'IC₅₀

L'IC₅₀ est déterminée par mesure de la vitesse initiale de la réaction dans les conditions décrites ci-dessus, après incubation de l'enzyme 10 min à 30°C avec le fer, l'ascorbate, le substrat à 1056 micromolaire et des concentrations d'inhibiteur variables. Les concentrations de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl)propan-1,3-dione utilisées varient de 10⁻¹⁰ à 10⁻⁴ M..

Les valeurs de K_m estimées de l'enzyme pour son substrat c'est à dire le 4-hydroxyphénylpyruvate, et les valeurs de I_{50} estimées à activités comparables, sont reportées dans le Tableau ci-après :

	HPPD native	SyN318	SyA318
Km	60uM	470uM	320uM
I50	80nM	80uM	40uM

Ces résultats confirment que les mutations réalisées dans la partie C-terminale de la protéine, si elles influent en diminuant l'affinité de l'enzyme pour le substrat (K_m), influent encore plus fortement en diminuant l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur (I50).

En effet le rapport I50 d'une HPPD mutante sur I50 de l'HPPD non mutante (qui est l'image de la perte d'affinité pour l'inhibiteur) est de 1000 et 500 pour SyN 318 et SyA 318 respectivement alors que le rapport K_m d'une HPPD mutante sur K_m de l'HPPD non mutante (qui est l'image de la perte d'affinité pour le substrat) est de 8 et 5 pour SyN 318 et SyA 318 respectivement. Ceci est bien l'exemplification que ces deux mutants ont une affinité un peu moindre pour le substrat de l'enzyme mais surtout une affinité très nettement plus faible pour les inhibiteurs de l'enzyme dont la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione.

Ces résultats confirment que le test de criblage colorimétrique décrit dans l'exemple 1 permet bien de détecter des HPPD mutées présentant une tolérance aux inhibiteurs

d'activité HPPD. Ils valident l'outil qu'on utilise pour cribler et identifier des mutants de l'HPPD tolérants aux inhibiteurs de l'HPPD. Cet outil de screening est rapide et simple d'utilisation et c'est pourquoi on l'utilise mais il est clair que tout autre outil peut être utilisé pour faire une analyse similaire; il serait possible d'utiliser

5 - un outil de criblage mesurant l'activité et son inhibition basé sur la disparition d'HPP (dosage radioactif, dosage spectrophotométrique ou autre) ou basé sur la consommation d'oxygène ou basé sur l'apparition d'homogénisate (avec couplage d'une autre activité enzymatique)

10 - un outil de criblage vivo, comme par exemple la croissance de bactéries sur HPP comme seule source de carbone en présence d'inhibiteurs de l'HPPD permettant de sélectionner les seuls clones avec une HPPD tolérantes

15 - il est de même tout à fait envisageable d'utiliser un screening vivo dans les plantes en utilisant des vecteurs de transformation des plantes, des systèmes de transformation, des systèmes de régénération et de sélection avec un inhibiteur de l'HPPD comme ceux décrits dans l'exemple 5 et 8.

Exemple 8: Evaluation de l'HPPD de *Synechocystis* non mutée et mutée, SyN318 et mutée SyA318, dans le tabac.

A) Construction des gènes chimères:

20 Le vecteur utilisé pour faire la construction permettant l'expression de l'HPPD de *Synechocystis* (sauvage ou mutantes) dans les plantes de tabac de type PBD6 s'appelle pRD224 (décrit dans l'exemple 5). Ce vecteur a été initialement conçu pour cloner tous les mutants de l'HPPD de *Pseudomonas* par simple remplacement du gène de l'HPPD tronquée de ce vecteur au niveau des sites Kpn I et BstE II. Il peut également servir au clonage du

25 gène de l'HPPD de *Synechocystis* en vue de la création d'une plante transgénique.

B) Stratégie de clonage

La séquence codant pour l'HPPD de *Synechocystis* est clonée dans le vecteur pRD224 par remplacement de la séquence codant pour l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* tronquée. Cependant elle ne peut pas être clonée directement entre les sites

30 Kpn I et BstE II, car les séquences N terminales des gènes d'HPPD de *Synechocystis* et de *Pseudomonas* sont très différentes. Mais le clonage entre le site Bam HI de l'OTP et le site BstE II est possible. Pour cela, il est nécessaire de recréer du côté 5', en amont de la

séquence HPPD, le site Bam HI suivi de la partie codant pour l'OTP située en aval de Bam HI.

Le gène de l'HPPD de *Synechocystis* contenu dans le vecteur pTRC 99A est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide des amorces A et B.

- 5 L'oligonucléotide A permet d'ajouter le site Bam HI en amont du gène de l'HPPD ainsi qu'une partie de la séquence de l'OTP entre le site Bam HI et le début du gène. L'oligonucléotide B permet d'ajouter le site BstE II en aval du gène. Les amorces A et B sont indiquées dans les SEQ ID NO 20 et 21 :

oligonucléotideA: 5'NNNNNNNNNN **GGATCC**GGTG CATGGAATTC
 10 GACTATCTTC^{3'}
 oligonucléotideB: 5'NNNNNNNNNN **GGTCAC**CAGT ATTCATAATG TTAATTATG^{3'}

La réaction d'amplification est réalisée à une température d'hybridation de 52°C. Les produits PCR sont ensuite séparés sur gel d'agarose. La bande d'ADN correspondant au gène HPPD est découpée puis purifiée.

- 15 Les fragments ainsi amplifiés sont digérés par Bam HI durant 1 heure à 37°C puis par BstE II durant 1 heure à 60°C. Cet insert est ensuite isolé sur gel d'agarose. La bande d'ADN correspondant au gène HPPD est découpée puis purifiée.

Ce fragment est ensuite cloné dans le vecteur binaire. Celui-ci est au préalable digéré par Bam HI et BstE II, puis séparé du fragment correspondant à l'HPPD tronquée
 20 sur gel d'agarose. Ce vecteur est alors purifié de la même manière que le gène de l'HPPD.

- La ligation entre le vecteur binaire et l'insert est réalisée sur la nuit à 16°C par la T4 DNA ligase. Le mélange de ligation est utilisé pour transformer des cellules d'*E.coli* DH10B électrocompétentes. Les clones positifs sont sélectionnés sur du milieu LB contenant de la kanamycine à 50µg/ml. La présence de l'insert d'intérêt dans le vecteur
 25 binaire est contrôlée sur gel d'agarose après minipréparation et digestion de l'ADN plasmidique par Bam HI et Sac I durant 1 heure à 37°C. Le vecteur recombinant est alors utilisé pour transformer des cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 électrocompétentes. La sélection se fait sur milieu LB contenant de la kanamycine à 50µg/ml. Ce vecteur recombinant est donc porteur d'un TDNA contenant le gène de
 30 résistance à la kanamycine, et une séquence codante pour un ensemble OTP-HPPD *Synechocystis* sous le contrôle du promoteur double histone et d'un terminateur Nos.

C) Transformation/Régeneration du tabac variété PBD6

La transformation est réalisée comme cela est présentée dans l'exemple 5 sauf que la sélection est faite d'abord avec 200 mg/ml de kanamycine.

Par contre les jeunes pousses obtenues sur kanamycine sont excisées et transférées individuellement sur un milieu dépourvu d'hormones pour favoriser leur enracinement, et
5 contenant du 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione pour sélectionner les plantules transgéniques tolérantes à cet herbicide. Il s'agit du milieu MS (SIGMA M-5519 4,4 g/l) contenant 350 mg/l de cefotaxine, 1% saccharose (p/v), et 0 ou 8 ppm de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione. La surproduction de l'HPPD dans les cellules transformées
10 permet le développement de plantules chlorophylliennes tolérantes au 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, alors que les plantules issues de cellules non transformées, sensibles à l'herbicide, apparaissent totalement blanches.

Après deux semaines, les racines sont suffisamment développées pour que les
15 plantules puissent être transférées en terre et cultivées en serre.

D) Résultats

A partir de 60 disques foliaires en moyenne, environ 40 pousses sont régénérées pour chaque construction. Après 2 jours de culture sur milieu en présence de la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, certaines
20 plantules commencent à blanchir. Après 8 jours d'enracinement, ce blanchissement est assez significatif pour être interprétable. A 8 ppm de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, on constate que seules 40% des plantes contenant l'enzyme sauvage survivent, contre 72% pour les plantes contenant l'enzyme SyA318 et 88% pour celle contenant l'enzyme SyN318. Les plantes contenant les
25 enzymes mutées présentent donc une meilleure tolérance que celles contenant l'enzyme sauvage.

Après plus d'un mois sur 8 ppm de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, le nombre de plantules vertes pour la transformation avec l'HPPD sauvage est de 0%, pour SyN318 ce pourcentage est de 17 %
30 et pour le mutant SyA318 il est de 19%.

Parallèlement si la régénération est faite sur la 2-cyano-1-[4-(méthylsulphonyl)-2-trifluorométhylphényl]-3-(1-méthylcyclopropyl)propan-1,3-dione(EP 496630), à des doses

de 5 à 10 ppm (un inhibiteur moins fort des HPPD), les trois gènes permettent d'obtenir des plantes morphologiquement tout à fait conformes. Ceci confirme si besoin était que la surexpression d'une HPPD mutée ou non mutée permet d'obtenir une tolérance au laboratoire.

- 5 Ces résultats semblent en accord avec les résultats obtenus *in vitro* par cinétiques enzymatiques et il semble bien possible d'établir une corrélation entre les mesures biochimiques *in vitro* et les résultats *in vivo*.

Ce dernier exemple confirme la cohérence au moins partielle entre screening *in vitro* (exemple 1), analyse biochimique (exemple 6) et tolérance d'une plante.

REVENDICATIONS

1. HPPD mutée fonctionnelle, moins sensible aux inhibiteurs d'HPPD, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une mutation dans sa partie C-terminale.
5
2. HPPD mutée selon la revendication 1, caractérisée en ce que la partie C-terminale de l'enzyme se distingue de sa partie N-terminale par un peptide de liaison
3. HPPD mutée selon la revendication 2, caractérisée en ce que le peptide de
10 liaison représentant l'extrémité N-terminale de la partie C-terminale de l'HPPD se situe entre 5 et 15 acides aminés en amont de l'acide aminé Asp161, par référence à l'HPPD de *Pseudomonas*.
4. HPPD mutée selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la partie C-terminale est constituée par la séquence protéique comprise entre
15 d'une part par le peptide de liaison et d'autre part par l'extrémité C-terminale de l'enzyme.
5. HPPD mutée selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la mutation est effectuée sur des acides aminés, qui sont remplacés par des acides aminés d'encombrement stérique supérieur.
- 20 6. HPPD mutée selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la mutation est effectuée sur des acides aminés de faible encombrement stérique.
7. HPPD mutée selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'acide aminé de faible encombrement stérique est la glycine (Gly).
8. HPPD mutée selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce
25 que l'acide aminé du site de mutation est remplacé par l'un des acides aminés suivants : glutamine (Gln), acide glutamique (Glu), leucine (Leu), isoleucine (Ile) ou tryptophane (Trp).
9. HPPD mutée selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la mutation est effectuée sur un acide aminé de la partie C-terminale commun à
30 plusieurs séquences d'HPPD.
10. HPPD mutée selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend dans sa partie C-terminale, la séquence peptidique suivante :

- Gly - Phc - Xaa - Yaa - Xab - Asn - Phe - Yab - Yac - Leu - Phc -

dans laquelle

Xaa et Xab représentent indépendamment l'un de l'autre la glycine (Gly) ou un acide aminé d'encombrement supérieur à la glycine, étant entendu que si l'un de Xaa ou

5 Xab représente Gly, alors l'autre est différent de Gly,

Yaa représente un acide aminé quelconque, de préférence Ala, Lys ou Glu^{*},

Yab représente un acide aminé quelconque, de préférence Lys, Ser, Arg ou Asn^{*}, et

Yac représente un acide aminé quelconque, de préférence Ala, Ser, Glu ou Gln^{*}.

11. HPPD mutée selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'un au
10 moins de Xaa ou Xab représente Leu, Glu, Trp ou Ile.

12. HPPD mutée selon la revendication 11, caractérisée en ce que Xab représente Glu, Trp ou Ile, de préférence Trp.

13. HPPD mutée selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que par référence à la séquence d'HPPD de *Pseudomonas*, les acides aminés mutés
15 sont choisis parmi les acides aminés suivants : Pro215, Gly298, Gly332, Phe333 Gly334 Gly336 et Asn337, préférentiellement les acides aminés Pro215 et Gly336.

14. HPPD mutée selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend une mutation choisie parmi les mutations suivantes : Pro215Leu, Gly336Glu, Gly336Trp ou Gly336Ile.

20 15. Séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD mutée selon l'une des revendications 1 à 14.

16. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, caractérisé en ce
25 que la séquence codante comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD mutée telle que définie précédemment.

17. Gène chimère selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'organisme hôte est choisi parmi les bactéries, par exemple *E. coli*, les levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, les champignons,
30 en particulier *Aspergillus*, les baculovirus, ou les cellules végétales et les plantes.

18. Gène chimère selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'organisme hôte est une cellule végétale ou une plante.

19. Gène chimère selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend en 5' de la séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD mutée, une séquence d'acide nucléique codant pour un peptide de transit de plante, cette séquence étant disposée entre la région promotrice et la séquence codant pour l'HPPD mutée de manière à permettre l'expression d'une protéine de fusion peptide de transit/HPPD mutée.

20. Protéine de fusion peptide de transit/HPPD mutée, l'HPPD mutée étant définie selon l'une des revendications 1 à 14.

21. Vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte caractérisé en ce qu'il contient au moins un gène chimère selon l'une des revendications 16 à 19.

22. Procédé de transformation d'un organismes hôte, caractérisé en ce que l'on intègre de manière stable dans ledit organisme hôte au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 15 ou un gène chimère selon l'une des revendications 16 à 19.

23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'organisme hôte est une cellule végétale.

24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'on régénère une plante à partir de la cellule végétale transformée.

25. Organisme hôte transformé, en particulier cellule végétale ou plante, caractérisé en ce qu'il contient une séquence d'acide nucléique selon la revendication 15 ou un gène chimère selon l'une des revendication 16 à 19.

26. Cellule végétale caractérisé en ce qu'il contient une séquence d'acide nucléique selon la revendication 15 ou un gène chimère selon l'une des revendication 16 à 19.

27. Plante transformée, caractérisée en ce qu'elle contient des des cellules transformées selon la revendication 26.

28. Plante selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'elle est régénérée à partir des cellules transformées selon la revendication 26.

29. Plante transformée caractérisée en ce qu'elle est issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées selon la revendication 28.

30. Plantes transformées selon l'une des revendications 27 à 29,

caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi les monocotylédones, notamment les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs, ou les dicotylédones, notamment le tabac, la soja, le colza, le coton, la betterave et le trèfle.

31. Graines des plantes transformées selon l'une des revendications 27 à

5 30.

32. Procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ comprenant des graines selon la revendication 31 ou des plantes transformées selon l'une des revendications 27 à 30, lequel procédé consiste à appliquer dans la dite surface du champ une dose toxique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les

10 graines ou plantes transformée avec le dit gène chimère selon l'invention.

33. Procédé de culture des plantes transformées selon l'une des revendications 27 à 30, lequel procédé consiste à planter les graines des dites plantes transformées selon la revendication 31 dans une surface d'un champ approprié pour

15 la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une dose toxique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour cible l'HPPD en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes

20 récoltées.

34. Procédé selon l'une des revendications 32 ou 33, caractérisé en ce que l'inhibiteur d'HPPD est choisi parmi les isoxazoles, en particulier l'isoxaflutole, les dicétonitriles, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl)

25 propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones, en particulier la sulcotrione, ou les pyrazolines.

Mus musculus	-----MTYNN--KGPKPERG-----RFLHFHS
Coccidioides immitis	MAPAADSPTLQ-----PAQPSD-----LN-----QYRGYDH
Mycosphaerella graminicola	MAPGALLVTSQNGRTSLYDSGYVP---APAAVVVGGE---VNYRGYHH
Hordeum vulgare	MPPTPTTAA-TGAAAVTPEHARP-----HR-MVRFNPRSDRHTLSFHH
Zea mais	MPPTPTAAAAGAAVAAAQAEAFRLVGHNFVFNPRSDRHTLAFHH
Arabidopsis thaliana	MGHQNAVSE-NQNHDDGAASSPGFKLVGFSGFVRKNPKSKDKVKVRFHH
Daucus carota	MGKK-QSEAE-ILSSNSNTSPATFKLVGFNFVFRANPKSDHFAVKRFHH
Streptomyces avermitilis	-----MTQTHHT-----PTARQADP-----FPVKGMDA
Pseudomonas fluorescens	-----MADLYEN-----PMG-----LMGFEF
Numérotation P. fluorescens	! 1 10
Mus musculus	VTFVGNAKQAASFYCNKMGFEPLAYRGLTGSREVSVSHVVKRGKIVFVL
Coccidioides immitis	VHWYVGNAKQAATYVTRMGFERVAYRGLETGSKAVASHVVRNGNITFIL
Mycosphaerella graminicola	AEWVGNAKQVAQFYITRMGFEPAHKGLETGSRFFASHVVQNNNGVRFVF
Hordeum vulgare	VEFWCADAASAAGRAFAFGALGAPLAARSDLSTGNSAHASQLLRSGSLAFLF
Zea mais	VELWCADAASAAGRFSFGLGAPLAARSDLSTGNSAHASQLLRSGSLFLF
Arabidopsis thaliana	IEFWCGDATNVARRFSWGLGMRFSKSDLTGNSMVHASVLLTSGDLRFLF
Daucus carota	IEFWCGDATNTSRFRSWGLGMPLVAKSDLTGNSVHASVILVRSANLSEVF
Streptomyces avermitilis	VVFAVGNAKQAA-HYSTAFGQLVAYS GPENSGRETASYVLTNGSARFVL
Pseudomonas fluorescens	IEFASPTPGTLEPIFEIMGFTKVATHR-----SKN--VHLYRQGEINLIL
Numérotation P. fluorescens	! 20 30 40 50
Mus musculus	CSALN-----PWN-----KEMGDHLVKHGDGVKDIAFEVEDC
Coccidioides immitis	TSPLR-SVEQA-----SRFP--EDEALLKEIHAHLERHGDGVKDVAFEVDCV
Mycosphaerella graminicola	TSPVRSSARQT---LKAAPLADQARLDQARLDKKGDKGVKDVAFEVDDV
Hordeum vulgare	TAPYANGCDA-----TASLPSFSADAARRFSADHGIASVVALRVADA
Zea mais	TAPYAHGADAA-----TALPSFSAARRFAADHGLAVRAVALRVADA
Arabidopsis thaliana	TAPYPSLSAGEIKPTTASIPSFHDGSCRSFFSSHGLGVRVAIEVEDA
Daucus carota	TAPYSPSTTSSGS---AAIPSFASGFHSPAAGHGLAVRAIALEVADV
Streptomyces avermitilis	TSVIK--P--A---TPWG-----HFLADHVAEHGDDGVVDLAEVDDA
Pseudomonas fluorescens	NNEPN-----S-----IASYFAAEHGPVCGMAFRVKDS
Numérotation P. fluorescens	! 60 70 80

FIG 1

Mus musculus
 Coccidioides immitis
 Mycosphaerella graminicola
 Hordeum vulgare
 Zea mais
 Arabidopsis thaliana
 Daucus carota
 Streptomyces avermitilis
 Pseudomonas fluorescens

Numérotation P. fluorescens

Mus musculus
 Coccidioides immitis
 Mycosphaerella graminicola
 Hordeum vulgare
 Zea mais
 Arabidopsis thaliana
 Daucus carota
 Streptomyces avermitilis
 Pseudomonas fluorescens

Numérotation P. fluorescens

Mus musculus
 Coccidioides immitis
 Mycosphaerella graminicola
 Hordeum vulgare
 Zea mais
 Arabidopsis thaliana
 Daucus carota
 Streptomyces avermitilis
 Pseudomonas fluorescens

Numérotation P. fluorescens

DHIVQKARAGAKIVREPWVEQDKFKVFAVLQTYGDTHTLVEKINYT
 ESFSAVRNGAEVVDVTRVEDDQIKMATIRTYGETTHTLIERSGYR
 LAVYENAVANGAESVSPHTDSCDEGDVISAIAIKTYGDTHTFIQRTTYT
 AEAFRASRRRGARPAFAPVDLGRG---FAFAEVELYGDVVLRFVSHPDGT
 EDAFRASVAAGARPAFAPVDLGRG---FRLAEVELYGDVVLRYVSYPDGA
 ESAFISVANGAIPSPPIVLNEA---VTIAEVKLYGDVVLRYVSYKAED
 AAFAEASVARGARPAFAPVELDDQ---AWLAEVELYGDVVLRFVSGREE
 RAAHAYAIHGAARSVAEPYELKDEHGTVLAATYGTKRHTLVDRGTGYD
 QKAYNRALDELGAQPIHIDTGPMLN---LPAIKGIGGAPLYLIDRFEGEG

! ! ! ! !
 90 100 110 120 130

G---RFLPGFEAPTYKDTLLPKLPRCNLEIIDHIVGNQPDQEMQASSEWY
 G---GFMPGYRMESNADATSKFLPKVVLERIDHCVGNDQWDEMERVCDYY
 G---PFLPGYRSCCTVDSANKFLPPVNLLEAIDHCVGNDQWDEMSDACDFY
 D---VPFLPGFEGVTNPDAVD---YGLTRFDHVGNVP---ELAPAAAYI
 AG-EPFLPGFEGVASPGAAD---YGLSRFDHIVGNVP---ELAPAAAYF
 TEKSEFLPGFERVEDASSFP-ID---YGIIRLDHAGVNV---ELGPALTYV
 G---LFLPGFEAVEGTASFPDLD---YGIIRLDHAGVNV---ELGPVVEYI
 G---PYLPGYVAAA---PIVEPAHRTFOAIDHCVGNVNELGRMNWVGFY
 S---SIYDIDFVYLEGVERNP-VG---AGLKVIDHILTHNVYGRMVYWANFY

! ! ! ! !
 140 150 160 170

LKNLQFHRFWSVDDTQVHTEYSLSRSIVVTNYEESIKMPINEPAPG-RKK
 EKILGFHRFWSVDDKIDICTEFSALKSIVMASPNDIVKMPINEPAKG-KKQ
 ERCLGFHRFWSVDDKIDICTEFSALKSIVMSSPNQVVKMPINEPAHG-KKK
 AGFTGFHEFAEFTAEADVGTGTTESGLNSVVLANNSEGVLLPLNEPVGTKRR
 AGFTGFHEFAEFTTETDVGTAEGLNSVVLANNSENVLLPLNEPVGTKRR
 AGFTGFHQFAEFTADDVGTAEGLNSAVLASNDEMVLPLINEPVGTKRR
 KGFTGFHEFAEFTAEADVGTLEGLNSVVLANNSENVLLPLNEPVGTKRR
 NKVMGFTNNMKEFVGDDIATEYSALMSKVADGTLKVKFFINEPALA-KKK
 EKLNFREARYF---DIKGEYTLGTSKAMSA PDGMIRIPLNEESSK--GA

*
 180 190 200 210 220

FIG 1 (suite)

Mus musculus	SQIQEYVDYNGGAGVQHIALKTEDIIITAIRHLRER-----GTEFLAAP-SS
Coccidioides immitis	SQIEEYVDFYNGAGVQHIALRTNIIIDAITNLKAR-----GTEFIKVP-ET
Mycosphaerella graminicola	SQIEEYVDFYNGAGVQHIALRTNIIIEAVSNLSR-----GVEFISVP-DT
Hordeum vulgare	SQIQTFLEHHGGPGVQHIAVASSDVLRLKMRARSAMGGDFDLPPLPK
Zea mais	SQIQTFLEHHGGPGVQHIALASSDVLRLKMRARSAMGGDFDLPPLPK
Arabidopsis thaliana	SQIQTFLEHHGGPGVQHIALASSDVLRLKMRARSAMGGDFDLPPLPK
Daucus carota	SQIQTFLEHHGGPGVQHIALASSDVLRLKMRARSAMGGDFDLPPLPK
Streptomyces avermitilis	SQIQTFLEHHGGPGVQHIALASSDVLRLKMRARSAMGGDFDLPPLPK
Pseudomonas fluorescens	SQIQTFLEHHGGPGVQHIALASSDVLRLKMRARSAMGGDFDLPPLPK
	230 240 250 260 270
Numérotation P. fluorescens	
Mus musculus	YYKLLRENLSAKIQVKESMDVLEELHILVD-YDEKG---YLLQIFTKPM
Coccidioides immitis	YYEDMKIRLKRQGLVDEDFETLKSLLID-DENG---YLLQLFTKHL
Mycosphaerella graminicola	YYENMLRLKAAGMKLEESFDIIQKLNILID-FDEGG---YLLQLFTKPL
Hordeum vulgare	YYEGVRRLAG--DVLSEAQIKECQELGLVD-RDDQG---VLLQIFTKPV
Zea mais	YYDGVRRRAG--DVLTEAQIKECQELGLVD-RDDQG---VLLQIFTKPV
Arabidopsis thaliana	YYQNLKRVG--DVLSDQIKECEELGLVD-RDDQG---TLLQIFTKPL
Daucus carota	YYKLNKRVG--DVLSDQIKECEELGLVD-RDDQG---TLLQIFTKPV
Streptomyces avermitilis	YYDTLGEWVG---DTRVPVDTLRELKILAD-RDEGD---YLLQIFTKPV
Pseudomonas fluorescens	YYEMLEGRLP---DHGEPVDQLQARGILLDSSVEGDKRLLLQIFSETL
	280 290 300 310
Numérotation P. fluorescens	
Mus musculus	QDRPTLFLEVIQR-----H-----NHQGFAGNFNSLFKAFEE-E
Coccidioides immitis	MDRPTVFIEIIQR-----N-----NFSGFAGNFRALFEAIE-E
Mycosphaerella graminicola	MDRPTVFIEIIQR-----N-----NFDGFAGNFKSLFEAIE-E
Hordeum vulgare	GDRPTLFLEIIQRIGCMKDEKGEYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYE
Zea mais	GDRPTLFLEIIQRIGCMKDEKGEYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYE
Arabidopsis thaliana	GDRPTLFLEIIQRIGCMKDEKGEYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYE
Daucus carota	GDRPTLFLEIIQRIGCMKDEKGEYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYE
Streptomyces avermitilis	GDRPTVFIEIIQR-----H-----GSMGFAGNFKALFEAIE-E
Pseudomonas fluorescens	MG--PVFFEFIOR-----K-----GDDGFEGNFKALFEAIE-E
	320 330 340
Numérotation P. fluorescens	

FIG 1 (suite)

Mus musculus	QALRGNLTDLEPNGVRSGM
Coccidioides immitis	QALRGTLI-----
Mycosphaerella graminicola	QDLRGNL-----
Hordeum vulgare	KSLEAKQS---AAVQGS--
Zea mays	KSLEAKQAAAAAAQGS--
Arabidopsis thaliana	KTLEAKQLVG-----
Daucus carota	KTLEAKQITGSAAA-----
Streptomyces avermitilis	QEKRGNL-----
Pseudomonas fluorescens	QVRRGVLTAD-----
	: ..
	!
Numérotation P. fluorescens	350

FIG 1 (fin)

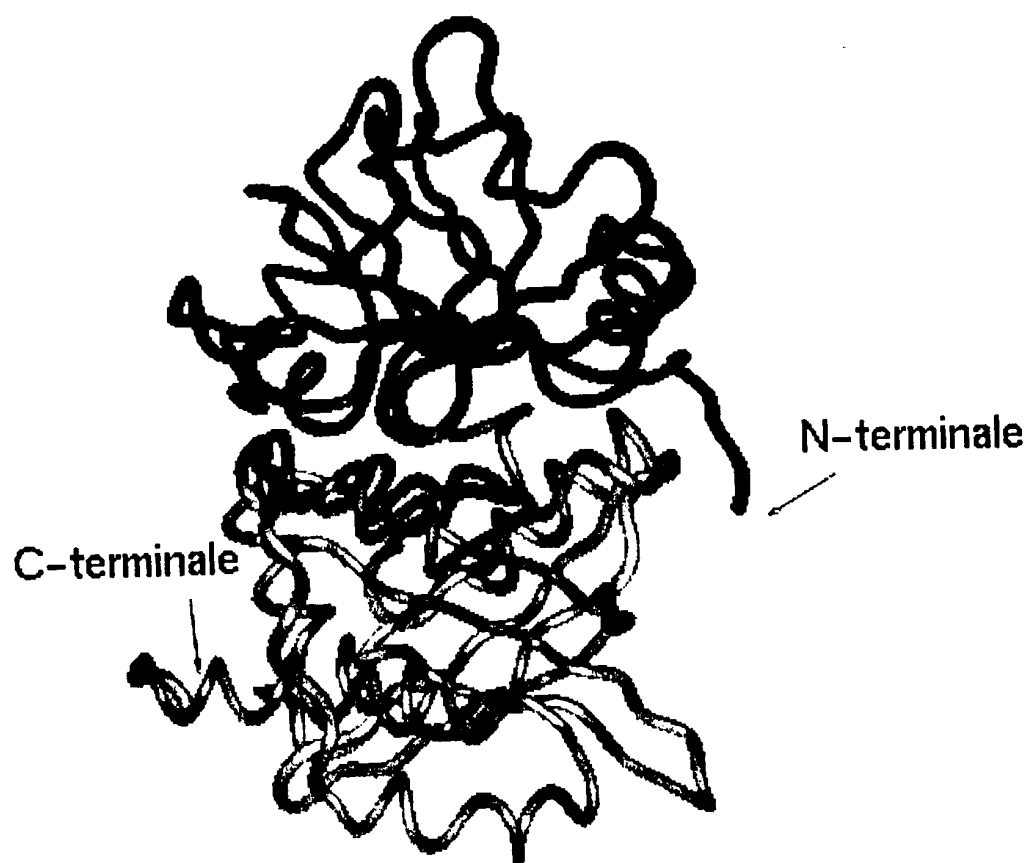


FIG 2

Seq_1: HPPD de *Pseudomonas fluorescens* (Bactérie) 357 aa

Seq_2: HPPD de *Synechocystis* (Cyanobactérie) 339 aa

Seq_1MADLYENPMGL MGFEFIELAS PTPNTLEPIF E.IMGFTKVA THRSKD..VH

Seq_2MEFDYLHLYV DDYQSAHRCY QRQWGFTCVN KIITDQGITG

Seq_1LYRQGAINLI LNNEPHSVAS Y..FAAEHGP SVCGMAFRVK DSQKAYKRAL

Seq_2IYQQGQILLL ISASESSLR YADYLQKHPP GVGEVAWQVA NWQKIQHQLS

Seq_1ELGAQPIHIE TGPMEINLPA IKGIGGAPLY LIDRFEGESS IYDIDFVFLE

Seq_2EL....Q.IE TTPVIH..PL TKAEGLTFLW WGDVH...HS IYPVRSELNQ

Seq_1GVDRHPVGAG LKIIDLHNLN VYRGRMAYWA NFYEKLFNFR EIRYFDIKGE

Seq_2NKTLL..GVG LTTIDHVVLN IADQFTQAS QWYQQVFGWS VQSFVTNTP

Seq_1YTGLTSKAMT APDGMIRIPL NEESSKGAGQ IEEFLMQFNG EGIQHVAFLS

Seq_2HSGLYSEALA SANGKVQFNL NCPTNN.SSQ IQTFLANNHG AGIQHVAFST

Seq_1DDLIKTWDHL KSIQMRMTA PPDTYYEMLE GRLPNHG.EP VGELQARGIL

Seq_2TSITRTVAHL RERGVNFKI PTGYYQQQRN SSYFNYASLD WDTLQCLEIL

Seq_1LDGSSESGDK RLLQIFSET LMGP..VFFE FIQRKG.DDG FGEGNFKALF

Seq_2LDDQDNTG.E RLLQIFSQP CYGVGTLFWE IIERHRAKG FGQGNFQALY

* *

Seq_1ESIERDQVRR GVLSTD

Seq_2EAVETLEKQL EVP..

FIG 3

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC AGROCHIMIE
- (B) RUE: 14-20 Rue Pierre BAIZET
- (C) VILLE: LYON
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69009

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Hydroxy-phényl pyruvate dioxycénase mutée, séquence d'ADN et obtention de plantes contenant un tel gène, tolérantes aux herbicides

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 21

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GAAGTTGCCC TCGCCCCACC CATCGTCGCC CTT

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GAAGTTGCCC TCGCCRAKCC CATCGTCGCC CTT

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CTTGAAGTTG CCCTCCCAA ACCCATCGTC GCC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CTTGAAGTTG CCCTCGTCAA ACCCATCGTC GCC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CTTGAAGTTG CCCTCGCTAA ACCCATCGTC GCC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTTGAAGTTG CCCTCRAKAA ACCCATCGTC GCC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAGCGCCTTG AAGTTGTCCT CGCCAAACCC ATC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CAGCGCCTTG AAGTTYTCCT CGCCAAACCC ATC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CAGCGCCTTG AAGTTCCACT CGCCAAACCC ATC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CAGCGCCTTG AAGTTDACTC GCCAAACCCA TC

32

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CGCTTGAAGT TNNNCTCINN AAACCCATCG TC

32

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GAACAGCGCC TTGAARAKGC CCTCGCCAAA CCC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GCCTTCCACG GAAGATTCGT CCAGCAGGAT ACC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

TCGAGAGAGA GGTGACCGAG AGA

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

TCGATCTCTC GGTCACCTCT CTC

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

ATTATGGAAT TCGACTATCT T

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

CAGTATTCAT AATGTTAATT ATG

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

CGGGCAAAAAG GATTARCCA AGGAACTTT CAAG

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

CGGGCAAAAAG GATTSCNCA AGGAACTTT CAAG

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 40 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

NNNNNNNNN GGATCCGGTG CATGGAATTC GACTATCTTC

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

NNNNNNNNN GGTCACCAAGT ATTCATAATG TTAATTATG

39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No PCT/FR 98/02374	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/53 C12N15/62 C12N15/82 C12N5/10 C12N9/02 A01H5/00 A01H5/10	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12Q A01H	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
Relevant to claim No	
A	WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE ;SAILLAND ALAIN (FR); ROLLAND ANNE (FR);) 5 December 1996 cited in the application see the whole document ---
A	LEE M. ET AL.: "The C-terminal of rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is indispensable for enzyme activity" FEBS LETTERS, vol. 393, no. 2,3, 16 September 1996, pages 269-272, XP002070559 see the whole document --- <div style="text-align: center;">-/--</div>
1-34	1-34
1-34	1-34
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>	
* Special categories of cited documents :	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">17 February 1999</div>	Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">24/02/1999</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <div style="text-align: center;">Kania, T</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No
PCT/FR 98/02374

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	GARCIA I. ET AL.: "Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA" BIOCHEMICAL JOURNAL. (1997 AUG 1) 325 (PT 3) 761-9. JOURNAL CODE: 9Y0. ISSN: 0264-6021., XP002070560 * the whole document, especially page 767, right hand column 1.44 - page 768, left hand column 1.45 * ---	1-34
A	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 July 1997 * the whole document, especially page 13, 1.20 - p 14, 1.4 * ---	1-34
A	PADGETTE S R ET AL: "SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF A CONSERVED REGION OF THE 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE ACTIVE SITE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 33, 25 November 1991, pages 22364-22369. XP002023053 see the whole document -----	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02374

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9638567 A	05-12-1996	FR 2734840 A	06-12-1996
		FR 2734841 A	06-12-1996
		FR 2734842 A	06-12-1996
		AU 6228696 A	18-12-1996
		BG 102131 A	31-07-1998
		CA 2219979 A	05-12-1996
		CN 1192243 A	02-09-1998
		CZ 9703809 A	18-03-1998
		EP 0828837 A	18-03-1996
		HR 960245 A	31-08-1997
		PL 323679 A	14-04-1998
		SK 161597 A	08-07-1998
WO 9727285 A	31-07-1997	AU 1845397 A	20-08-1997
		EP 0877793 A	18-11-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De le internationale No

PCT/FR 98/02374

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/53 C12N15/62 C12N15/82 C12N5/10 C12N9/02 A01H5/00 A01H5/10		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N C12Q A01H Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE :SAILLAND ALAIN (FR); ROLLAND ANNE (FR);) 5 décembre 1996 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-34
A	LEE M. ET AL.: "The C-terminal of rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is indispensable for enzyme activity" FEBS LETTERS, vol. 393, no. 2,3, 16 septembre 1996, pages 269-272, XP002070559 voir le document en entier --- -/--	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 17 février 1999		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 24/02/1999
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel.: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Kania, T

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De le internationale No

PCT/FR 98/02374

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites. avec le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visees
A	<p>GARCIA I. ET AL.: "Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, (1997 AUG 1) 325 (PT 3) 761-9. JOURNAL CODE: 9Y0. ISSN: 0264-6021., XP002070560</p> <p>* le document en entier, pref. p.767 col. droite 1.44 - p.768 col. gauche 1.45 *</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-34
A	<p>WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA)</p> <p>31 juillet 1997</p> <p>* le document en entier, pref. p.13 1.20 - p.14 1.4 *</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-34
A	<p>PADGETTE S R ET AL: "SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF A CONSERVED REGION OF THE 5-ENOLPYRUVYL SHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE ACTIVE SITE"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 33, 25 novembre 1991, pages 22364-22369, XP002023053</p> <p>voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-34

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Union internationale No

PCT/FR 98/02374

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membres(s) de la famille de brevets(s)	Date de publication
WO 9638567 A	05-12-1996	FR 2734840 A	06-12-1996
		FR 2734841 A	06-12-1996
		FR 2734842 A	06-12-1996
		AU 6228696 A	18-12-1996
		BG 102131 A	31-07-1998
		CA 2219979 A	05-12-1996
		CN 1192243 A	02-09-1998
		CZ 9703809 A	18-03-1998
		EP 0828837 A	18-03-1996
		HR 960245 A	31-08-1997
		PL 323679 A	14-04-1998
		SK 161597 A	08-07-1998
WO 9727285 A	31-07-1997	AU 1845397 A	20-08-1997
		EP 0877793 A	18-11-1998